

WP8003: イオン交換クロマトグラフィー (IEX) – MALS 法による蛋白質の分離解析

 Hadar Amartely, Ph.D.¹, Mario Lebendiker, Ph.D.¹ and Daniel Some, Ph.D.²
¹エルサレムヘブライ大学応用構造生物学ウォフソンセンター ²Wyatt Technology Corporation

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

概要

多角度光散乱とイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた系 (IEX-MALS) は、不均一な試料中の蛋白質、蛋白質複合体、ペプチドの絶対分子量測定を可能にし SEC カラムの限られた分離能による SEC-MALS のいくつかの限界を克服することができます。IEX-MALS 法は、天然のオリゴマー、電荷変異体、修飾蛋白質、蛋白質混合物試料の性状解析と共に、品質管理にも有用な手法です。

はじめに

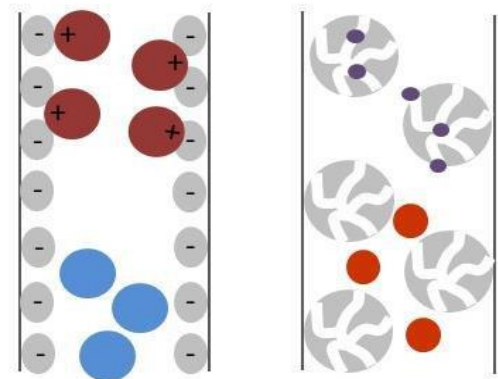
SEC-MALS は蛋白質性状解析のための一般的な方法として広く知られており、この方法は凝集体、複合体や修飾体の構造解析と共に分子量の決定 (M) と化学量論を決定できます^{1,2}。また同時に測定される動的光散乱 (DLS) は、溶出する各分子種の大きさ (流体力学的半径、 R_h) を決定します。

SEC-MALS または SEC-DLS によって最適な結果を得るためには、MALS 解析に先立って試料中に存在するさまざまな蛋白質分子種を分離する必要があります。しかしながら SEC カラムでは、試料中に存在する異なる蛋白質、例えば、酸性と塩基性変異体のモノクローン抗体 (mAbs)、流体力学的半径の近い異なる蛋白質、分子量の近いオリゴマーなどを分離することが困難な場合があります。さらに、SEC カラムで、高分子オリゴマーまたは凝集体が蛋白質のピークと完全に分離できない場合には、LS 信号強度の強い凝集体がその後で溶出し、より低分子のオリゴマー分子量決定に影響を与えることがあります³。

これらの SEC カラムによる分離能力の限界は、流体力学的サイズ以外の分子の性質に基づく分離技術を組み合わせることで、打開することができ、これらの分離手法と MALS を組み合わせることで、MALS にとって信頼性の高い解析が可能になります。このホワイトペーパーでは、MALS にイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせた例 (IEX-MALS) を、不均一な蛋白質標品の強力な分離と解析法として紹介します。

IEX クロマトグラフィー

IEX は支持マトリックスとの異なるイオン相互作用に基づく蛋白質 (および他の高分子) の高度で選択的な吸着クロマトグラフィーです。アニオン交換体 (AIEX) とカチオン交換 (CIEX) はそれぞれ負および正に荷電した分子を結合します。SEC カラムと異なり、IEX は溶出ピークの分子量を推定するカラム検定法はないため、オンラインで分子量を推定するためには MALS が必須になります。



Ion exchange
(surface charge)

イオン交換
(表面電荷)

Size exclusion
(hydrodynamic size)

サイズ排除
(流体力学的サイズ)

UV 対 dRI

イオン交換クロマトグラフィーにおける塩濃度勾配による溶出では、移動相の屈折率が大きく変化し、しばしば試料のピークによる変化よりもずっと大きな変化を生じます。そのため、濃度の決定には UV 検出器を用いるのが、最も簡単 - しばしば必要 - です。[注：塩濃度勾配でなく、pH 勾配だけを用いる場合にはそれほど大きな屈折率の変化は生じません。]

しかしながら、示差屈折率 (dRI) を濃度測定に用いると、以下のような利点があります：

- dRI は一般的な測定法で、発色団や蛍光団の存在に依存しない。
- ほとんどすべての水溶液中の蛋白質は誤差 1-2% で同じ dRI 応答 (dn/dc) を持つ。
- UV と dRI の組み合わせによって、糖蛋白質や蛋白質-多糖ワクチンのような複合体の性状解析が可能である。

特に, Wyatt 社製 **Optilab**® dRI は、勾配によって生じる変化の全領域で比較的小さなシグナルの場合でも測定することができます。

ここでの紹介例は UV 検出が用いられていますが、屈折率での解析も行っています。dRI による IEX-MALS の解析は別のアプリケーションノートで紹介します。

材料と方法

解析は FPLC システムに **miniDAWN**® (WyattQELS™: DLS 測定モジュール内蔵) を接続して行いました。濃度は、FPLC の UV 280 nm の吸収シグナルで検出しました。

Optilab® 示差屈折計 (dRI) でも濃度解析のための dRI データを取得しました。通常 dRI 解析は塩濃度のプロファイルが直線的で、溶出ピークが完全に濃度勾配中に収まっていれば適応できます。

データは、解析ソフトウェア **ASTRA**® で解析しました。dn/dc の値は 0.185 mL/g を用いました。この dn/dc 値は蛋白質の溶出が 50–200 mM の NaCl 濃度溶液で起こっていれば適用できます。

IEX 法での分離は、低電荷の不純物が、塩濃度勾配が立ち上がる前に完全に溶出され、LS ピークがベースラインに戻り、また高電荷分子種が完全に溶出されて塩濃度勾配の最後に LS ベースラインに戻るようデザインしました。

BSA の IEX-MALS

BSA は強陰イオン交換カラムを用いて精製しました。精製は何回か繰り返し再現性を確認しました。

平衡化および洗浄には、20mM TrisHCl、pH 8 +50mM NaCl バッファーを用いました。BSA は 0.5 mg または 1 mg 注入しました。カラムボリューム (CV) 30 もしくは 15 で、平衡化溶媒に 15-70% の 500mM NaCl をグラジエント溶出しました。より精密な BSA オリゴマーの分離には 2 mg BSA を注入し、同じ移動相で 40% と 50% のステップグラジエントを行いました。

mAb の SEC- および IEX-MALS

異なる 2 種の mAb を SEC-MALS および IEX-MALS を用いて解析しました。

MAB1

SEC: 移動相には 20 mM リン酸ナトリウム+100mM NaCl、pH 7.4 が用られ、0.2 mg の mAb1 が注入されました。

IEX: 平衡化及び洗浄バッファーは、20 mM 酢酸ナトリウム +100mM NaCl、pH 5 が用いられ、0.2 mg の mAb1 が注入されました。溶出グラジエントは平衡化溶媒に 1M NaCl を 15–25%、13 CV (カラムボリューム) で行われました。

MAB2

SEC: 移動相には 150 mM NaCl 存在下、20 mM 酢酸ナトリウム+150mM NaCl、pH 5 を用いられ、0.23 mg mAb が注入されました。

IEX: 平衡化および洗浄バッファーは 50 mM NaCl 存在下、20mM 酢酸ナトリウム+50mM NaCl、pH 5 が用いられ、0.6 mg の mAb2 をカラムに注入しました。溶出グラジエントは平衡化溶媒に 500 mM NaCl を 25–50%、15 CV で行われました。

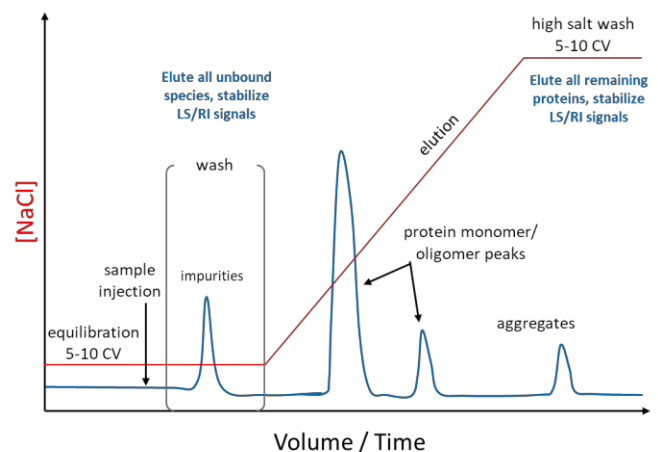


図 1. イオン交換クロマトグラフィーの模式図

結果と考察

BSA は一般的に SEC-MALS システムの状態を確認するために用いられていますが、IEX においても、異なるグラジエントプロフィールでの、精度と再現性を評価するために用いました。市販の 2 種の mAb を、それらのバイオ治療薬の重要な性質である電荷の変異体の存在を理解するために MALS で解析しました。

BSA

BSA は、ほぼモノマーとして存在しますが、若干の断片と共に、低濃度のダイマーとトリマーを含んでいます。IEX-MALS の実験では、BSA モノマーは単純に 30CV の、直線的な塩グラジエントでオリゴマーと分離されました(図 2A)。各ピークは繰り返し実験において若干異なる溶出時間に溶出されましたが、MALS によって同定される分子量は同じであり、主ピークはモノマーの期待される値と一致しました。ダイマーの分子量は若干小さく算出されましたが、これはモノマーのピークと完全に分離できていないためであると考えられます。19 分の溶出時間には、断片と思われるピークが見られます。

グラジエントの傾きが小さいため、溶出されるピークは幅が広く、蛋白質は大きな溶出容積になっているため、ピークは比較的低くなります。そのため、この IEX-MALS 実験では標準的な SEC-MALS よりも多くの試料 (0.5–1 mg) が必要になります。

より鋭いグラジエントは分離能を減少させますが、より高いピークになり、シグナル感度は改良されます(図 2B)。これは低純度の試料を主としてメインピークを解析したい場合には有用です。

次にモノマーとダイマーのピーク分離を改良するために 35% [NaCl] のステップグラジエントに続いて、直線的なグラジエントを加える方法を行いました。35% という値は BSA モノマーのピークの位置のバッファの電導度から選択しました(図 2C)。モノマー分子量の 67 kDa はピーク全体にわたって一様であり、モノマー全てを溶出させるのに、十分量の液を送液しました。塩濃度ステップグラジエントをより検討することで、直線的グラジエントを開始する手前の 30 分付近に検出される断片のピーク分離や、より高い塩濃度にする事で、ダイマーとトリマーの分離を改善できる可能性があります。

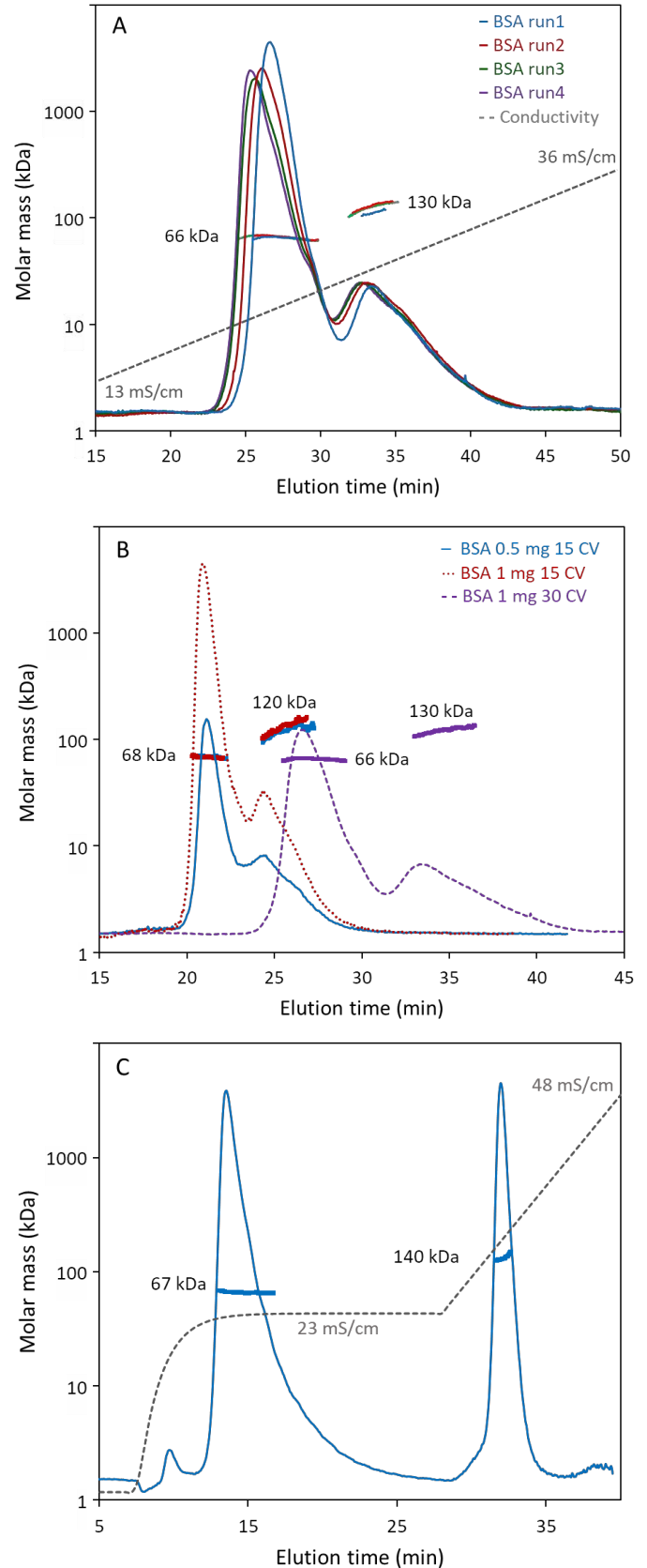


図 2. 異なるグラジエントプログラムによる BSA の AIEX-MALS 測定: A) 30CV にわたる 15-70% の 500 mM NaCl の直線グラジエント; B) 30CV および 15CV にわたる 15-70% の 500 mM NaCl の直線濃度勾配; C) 35% のステップグラジエントと 10CV にわたる 35-100% の直線グラジエント。クロマトグラムは、90° の LS, 280 nm の UV 吸収、およびバッファの電導度と MALS によって決定された各ピークの分子量が示されている。

MABs

抗体には通常電荷変異体（酸性及び塩基性変異体と言われる）即ち分子量は非常に近いが、グリコシル化のパターン、アミデーシオン/デアミデーシオン、シアル化/脱シアル化、C末端リシンの切断などが大きく異なる変異体の存在が知られています⁴。変異体は異なる流体力学的構造を示すこともあります⁵。

SEC-MALS 解析の結果、mAb1 と mAb2 はいずれも非常に高い均一性を示すことが分かりました(図 3A 及び B)。しかし CIEX-MALS では mAb の変異体を分離測定することができました。クロマトグラムにおける各ピークの MALS および DLS による分子量と半径の解析結果を図 3C 及び 3D に示します。これらの変異体は流体力学的半径 R_h が近いため、SEC では分離されなかったことが判明しました。

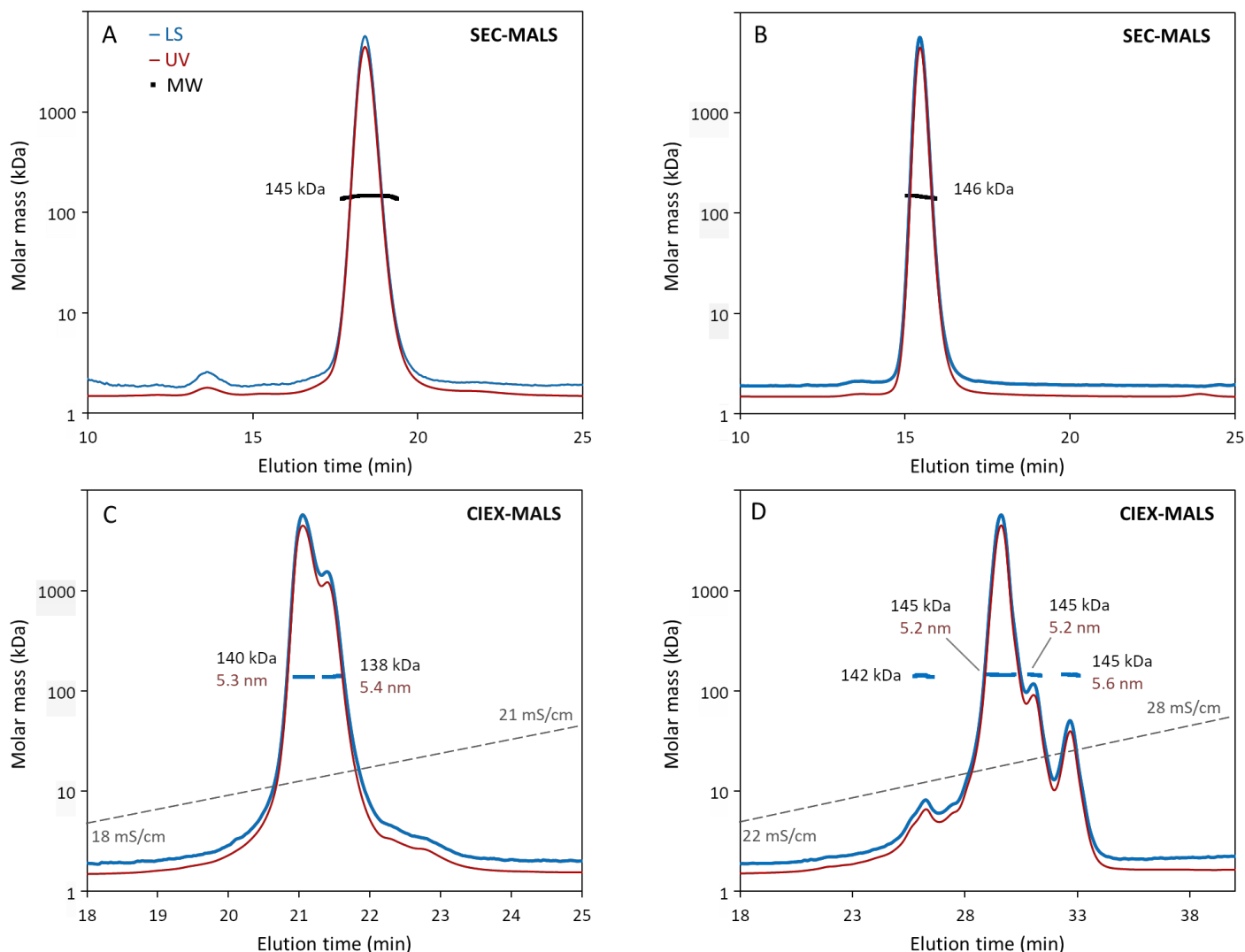


図 3. モノクローン抗体の SEC-MALS および CIEX-MALS 測定結果

A と B は各々、mAb1 (A) 及び mAb2 (B) の SEC-MALS の測定結果。C と D は、各々 mAb1 (C) 及び mAb2 (D) の CIEX-MALS の測定結果です。クロマトグラムは LS (90°) と 280nm の UV、およびバッファの電気伝導度と MALS で測定した各ピークの分子量、分子半径 (C,D のみ) を表示しています。見やすくするために LS のトレースは垂直方向にオフセットしています。

mAb1

2 種の変異体には MALS-UV で決定された明らかに小さな分子量の差異が見られました。この差異はマイナーな配列の違い (2 つのトリプトファンが UV を吸収しない別のアミノ酸で置換されている) またはグリコシル化の程度の違いによるものと思われます。差異の原因をはっきりさせるためには質量分析のような精度の高い方法で解析する必要がありますが、

既に IEX-MALS は変異体間に分子量や性質の違いが存在することを示しています。

mAb2

MALS の結果、変異体は同じまたは非常に近い分子量を持つことが明らかになりました。このことは、これらが単量体の mAb の電荷変異体であることを示しています。

展望

イオン交換クロマトグラフィーは分離が困難な時に、電導度や pH 勾配、カラムの電荷の正負や結合強度を任意に変更できる柔軟性を持ち、その結果 IEX-MALS は水溶性緩衝液中で幅広い分析物を分析することができる可能性があります。

IEX は分子の大きさにはあまり依存しないため、一つのカラムで多種類のペプチド、蛋白質、核酸、複合体、界面活性剤のミセルに取り込まれた膜蛋白質やナノディスクなど、一つの SEC カラムでは分離できない化合物でも分析可能です。

IgM、ウイルス様粒子、小さな顆粒や多くのバイオ高分子には、ポアサイズの大きなカラムが適しています。

この技術は、分離用 IEX に MALS や DLS を組み合わせて発展させれば、絶対分子量や分子の大きさの解析まで可能でより広く解析の範囲を拡大できると考えられています。



WYATT
TECHNOLOGY

© 本資料の全著作権は、Wyatt Technology Corporation が所有しています。

Wyatt 社の書面による事前の許可なしに、本書のいかなる部分も、電子的、機械的、写真複写、録音、またはその他の方法で、複製、検索システムに保存、または送信することはできません。

この出版物には、Wyatt Technology 社の商標またはサービスマークが 1 つ以上表示されている場合があります。

Wyatt Technolog 社の商標およびサービスマークのリストについては、<https://www.wyatt.com/about/trademarks> を参照してください。

結論

IEX-MALS は SEC-MALS とは異なる分離原理を用いることにより、相補的な分離を実現させます。IEX-MALS は蛋白質の品質管理や性状解析に有用な技術であり、ここでは、純粋な蛋白質と複合体試料に適用できることが明らかになりました。特に同等の流体力学的半径を持つ場合や他の理由で同時に溶出する分子種であるために標準的な SEC では分離できないような試料を解析する際に有用であることが判明しました。

謝辞

Danyl Biotech 社 (Rehovot, Israel)、特に、本研究で用いた AKTA-MALS 系についての助力と立ち上げについて Ayala Tsadok 氏に感謝します。

文献

1. Wyatt, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal Chim Acta* 272, (1993).
2. Foltá-Stogniew, E. & Williams, K. R. Determination of molecular masses of proteins in solution: Implementation of an HPLC size exclusion chromatography and laser light scattering service in a core laboratory. *J Biomol Tech* 10, 51–63 (1999).
3. Amartely, H., Avraham, O., Friedler, A., Livnah, O. & Lebediker, M. Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. *Sci Rep* 8, 6907 (2018).
4. Khawli, L. A. *et al.* Charge variants in IgG1. *MAbs* 2, 613–624 (2010).
5. Du, Y. *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *MAbs* 4, 578–585 (2012).